

# Cultius modificats genèticament resistents a herbicides

06/06/2014

UAB

Marina Noguera Roa

# Índex

1. Introducció .....	1
2. Herbicides implicats en la biosíntesi d'aminoàcids .....	2
3. L'herbicida Glifosat .....	3
3.1 Antecedents, definició i característiques físico-químiques .....	3
3.2 Mecanisme d'acció .....	3
3.3 Mecanismes de resistència .....	6
3.3.1 Alteració del gen .....	7
3.3.2 Insensibilitat mitjançant la desintoxicació .....	8
4. Visió actual .....	10
5. Conclusions .....	11
6. Bibliografia .....	1



# 1. INTRODUCCIÓ

El desenvolupament de diferents famílies d'herbicides a partir de la dècada del 1940 ha donat lloc a l'idea que el control químic és la solució final per l'eradicació de les males herbes, i s'ha convertit, des de llavors, en el mètode principal utilitzat per els productors agropecuaris, que ha acabat generant una forta dependència dels agroquímics (Pollegioni, Schonbrunn, & Siehl, 2012).

Un herbicida és un producte químic que inhibeix o interromp el creixement i desenvolupament d'una planta. Són àmpliament utilitzats en l'agricultura, l'indústria i en zones urbanes ja que si s'utilitzen correctament proporcionen un control eficient de les males herbes a un baix cost. Tanmateix, en els últims anys és demostra que no s'han eradicat les males herbes i que a més a més algunes han augmentat la seva presència.

L'aparició de les males herbes resistents a herbicides ha ocorregut relativament tard respecte altres plaguicides, ja que no va tenir lloc fins a finals de la dècada dels 60 quan és va informar del primer cas de resistència descrit en poblacions de *Senecio Vulgaris* (Xenixell) a les triazines (inhibidors de la fotosíntesi) (Duke & Powles, 2009).

La resistència als herbicides és la capacitat que han desenvolupat les poblacions de males herbes prèviament susceptibles a un cert herbicida per resistir a aquest compost i completar el seu cicle biològic quan l'herbicida és aplicat en les seves dosis normals; aquesta capacitat s'ha incrementat seriament en els últims anys. Aquesta resistència està associada a una alta pressió de selecció imposada per l'ús repetitiu d'altres dosis d'herbicides amb compostos altament persistents. A mesura que s'incrementa la taxa de mortalitat també augmenta la taxa de pressió de selecció que s'imposa amb l'herbicida. Per tant, la resistència de les males herbes als herbicides és un procés evolutiu de resposta a un fenomen d'estrès químic.

Actualment existeixen 403 casos únics (espècies per llocs d'acció) de males herbes resistents a herbicides en tot el món. Les males herbes han desenvolupat resistència a 21 dels 25 herbicides amb lloc d'acció conegut i a 148 diferents herbicides(<http://www.weedscience.org>).

Les males herbes causen considerables pèrdues en els sistemes de producció, ja que competeixen amb el cultiu per la llum, l'aigua i els nutrients, les tècniques actuals de control combinen l'ús de tècniques culturals i mecàniques amb herbicides per superar l'efecte competitiu, tanmateix la introducció l'any 1976 per l'empresa Monsanto de cultius OMG resistents a herbicides, comporta una nova opció d'ampli espectre per el control de les males herbes, amb major flexibilitat per tractar quan sigui necessari (Duke & Powles, 2009).

En aquest treball s'identifica els mecanismes d'acció dels herbicides més utilitzats avui dia, els inhibidors de la biosíntesi d'aminoàcids, especialment de l'herbicida Glifosat, i les tècniques de modificació genètica utilitzades en l'obtenció de cultius resistents a aquest herbicida.

## 2. HERBICIDES IMPLICATS EN LA BIOSÍNTESI D'AMINOÀCIDS

Els herbicides d'una mateixa família química tenen propietats químiques similars i generalment el mateix mètode d'acció. Les principals famílies químiques d'herbicides són: les triazines, els fenoxiacètics, les sulfonilureases i les imidazolinonas.

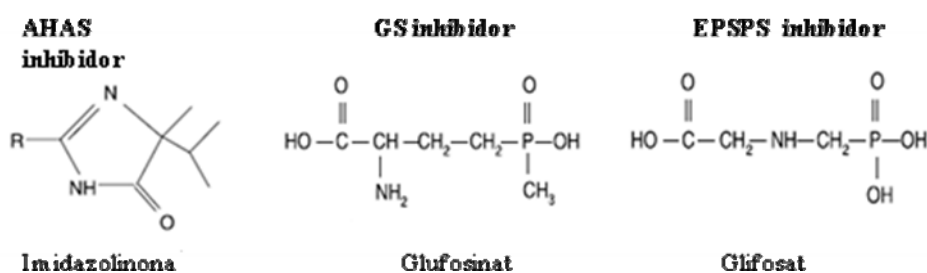
Tanmateix, la forma més útil de classificar els herbicides és segons el seu mètode d'acció. Els herbicides amb el mateix mètode d'acció tenen el mateix comportament d'absorció i transport, i produeixen síndromes similars en les plantes tractades.

Els herbicides actuen inhibint una proteïna o un enzim, que dona lloc al bloqueig de processos vitals de la planta. Poden actuar en el creixement, en la fotosíntesi o en la síntesi de proteïnes, pigments, lípids i/o d'aminoàcids. Degut a la seva baixa toxicitat per als mamífers i l'alta efectivitat en el control de la mala

herba, els herbicides inhibidors de la biosíntesi d'aminoàcids són opcions ideals per el desenvolupament de cultius tolerants a herbicides.

Existeixen varies famílies d'herbicides que afecten la síntesi d'aminoàcids, els quals són essencials pel desenvolupament i creixement de la planta. Degut a que els animals no sintetitzen tots els aminoàcids necessaris, ja que els essencials els obtenen de la dieta, els herbicides inhibidors de la biosíntesi d'aminoàcids essencials tenen un menor impacte en els animals que herbicides amb altres mètodes d'acció. Per això, la via de biosíntesi d'aminoàcids és objecte molt desitjable per el descobriment de nous herbicides.

Els herbicides inhibidors de la biosíntesi d'aminoàcids poden actuar sobre 3 enzims; acetohidroxiàcid sintetasa (AHAS), també anomenada sintetasa acetolactat (ALS), la glutamina sintetasa (GS) i la 5-enolpiruvil siquimat-3-fosfat sintetasa (EPSPS) (Fig1).

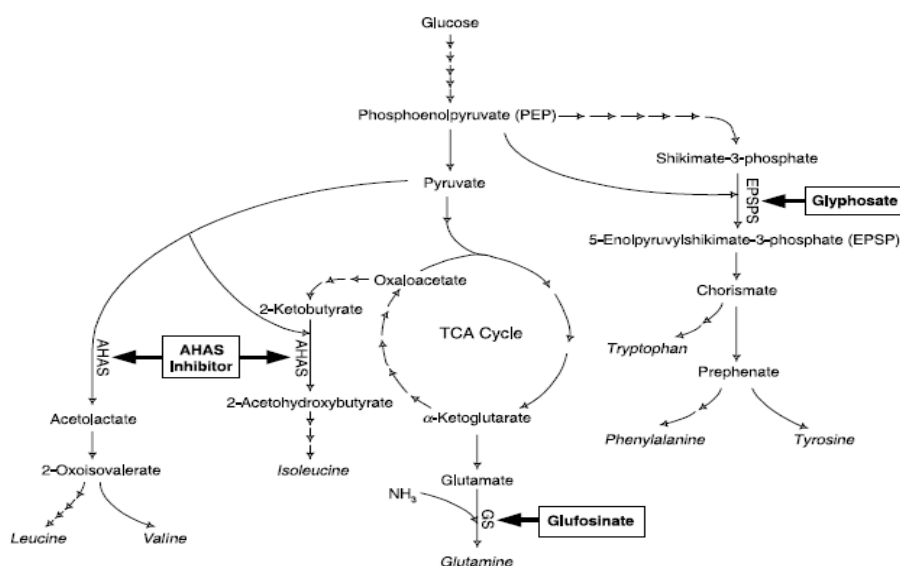


**Fig 1.** Fórmules químiques dels herbicides inhibidors de la biosíntesi d'aminoàcids.

La AHAS catalitza la primera reacció en la via de síntesi d'aminoàcids de cadena ramificada (els essencials Leucina, Valina i Isoleucina). Les imidazolinones conformen la principal família d'inhibidors de AHAS comercialitzats. Aquests s'uneixen a l'enzim AHAS en el lloc d'entrada del substrat, evitant la possibilitat d'unió amb el substrat i inhibint així l'activitat catalítica de l'enzima.

La GS és una proteïna responsable d'un dels principals mecanismes d'assimilació de amoni en les plantes i de la síntesi de Glutamina, ja que catalitza la conversió de L-glutamat a L-glutamina mitjançant l'assimilació d'amoniàc. El Glufosinat, l'inhibidor principal d'aquesta enzima, competeix amb el substrat per unir-se a la GS i bloquejar-la, degut a la gran similitud entre les estructures de les formes de L-glufosinat i L-glutamat. La inhibició per Glufosinat resulta en una deficiència de glutamina i l'acumulació excessiva d'amoniàc en la planta que destrueix les membranes cel·lulars.

L'EPSPS catalitza la síntesi de EPSP, un precursor de la síntesi d'aminoàcids aromàtics. El Glifosat interfereix amb la biosíntesi d'aquets aminoàcids mitjanant la inhibició de la EPSPS, gràcies a la similitud d'estructura amb el substrat natural, provocant la deficiència dels aminoàcids aromàtics i així la mort de la planta.



**Fig. 2** Vies de biosíntesi d'aminoàcids de cadena ramificada, d'aminoàcids aromàtics i de glutamina en les plantes on es mostra els tres enzims, AHAS, GS i EPSPS, inhibits per els herbicides AHAS inhibidors, Glufosinat i Glifosat respectivament.

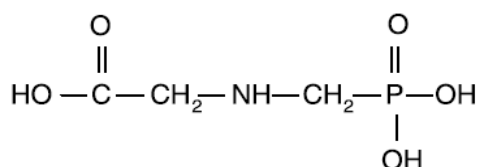
Entre els cultius existents resistents a herbicides, el més estès i conreat arreu del món és basa en la resistència a l'herbicida inhibidor de la biosíntesi d'aminoàcids aromàtics, el Glifosat (Castle et al., 2014).

### 3. L'HERBICIDA GLIFOSAT

#### 3.1 ANTECEDENTS, DEFINICIÓ I CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES

El Glifosat va ser descobert com ha herbicida l'any 1971 pel científic John E. Franz treballador de la companyia Cheminova, actual Monsanto, i introduït al mercat l'any 1974 per la mateixa companyia sota el nom de Glyphos® (Cheminova, 2001). És un herbicida d'ús agrícola, urbà i industrial, efectiu per destruir tot tipus de plantes, incloent gramínies, perennes i llenyoses. Actualment és l'herbicida més utilitzat i conegut en tot el món.

Es tracta d'un anàleg aminofosfonat del aminoàcid natural glicina (N-fosfonometilglicina,  $C_6H_{17}N_2O_5P$ ). El nom prové de la contracció de glicina, fòsfor i -at, que designa la base conjugada d'un àcid.



**Fig. 3.** Àcid Glifosat

El Glifosat – àcid fosfonometiliminodiacètic, és aminat donant lloc a varies sals diferents de Glifosat, sent les més habituals: isopropilamina, amònica, potàssica y sòdica.

Actualment existeix una ampla gamma de formulacions comercialitzades en tot el món basades en les sals abans citades, tenint la sal d'isopropilamina com a component actiu a la marca més coneguda i utilitzada, Roundup® de Monsanto (Alibhai & Stallings, 2001).

És un herbicida post emergent, és a dir, s'aplica després de l'emergència del cultiu i de la mala herba, en els seus primers estadis de desenvolupament quan són més susceptibles i la seva competència és mínima. També és sistèmic; s'aplica al sòl o al fullatge però és absorbit i transportat per tota la planta, d'ampli espectre i no selectiu, exerceix toxicitat sobre tota classe de vegetació, però és segur des del punt de vista ambiental, ja que té persistència limitada i baix moviment en l'aigua subterrània.

La toxicologia del Glifosat, tant del material actiu com dels seus formulats ha sigut investigada profundament all llarg de 30 anys. Tant la matèria activa com els seus metabòlits són considerats productes de baixa toxicitat per humans, tant aguda com crònica, donat que la seva activitat herbicida és realitza en una via metabòlica que no és troba en vertebrats. Les plantes tractades amb Glifosat moren lentament en els dies o setmanes següents (Monsanto imagine, 2008).

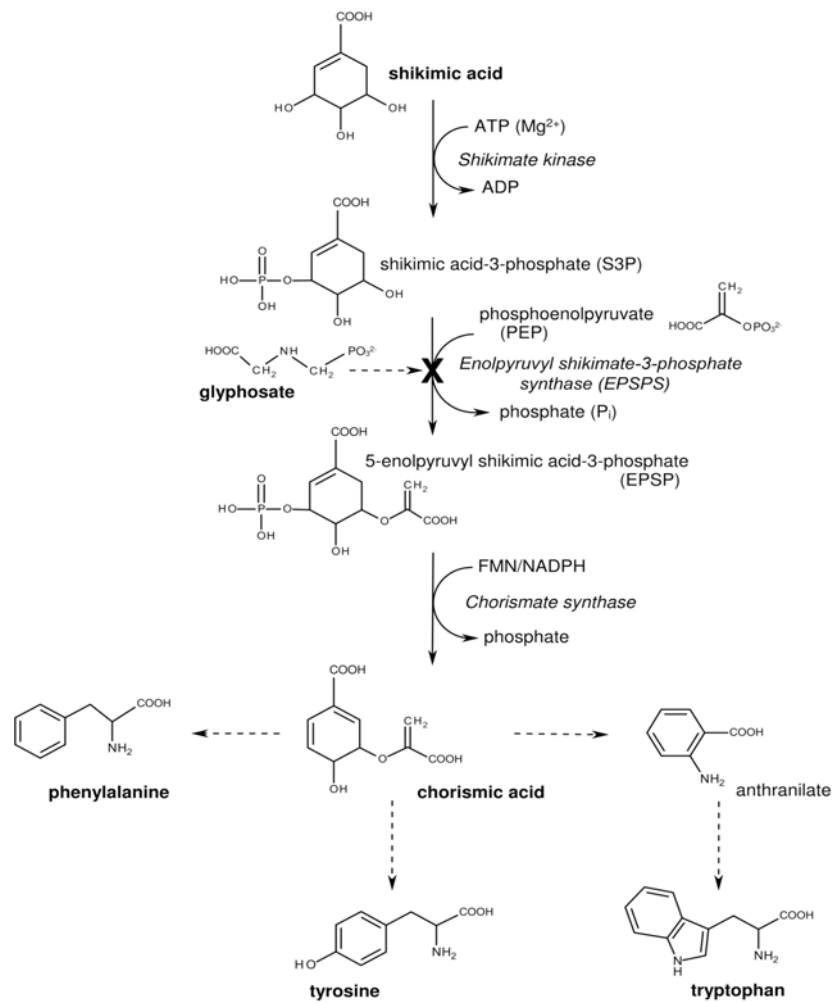
#### 3.2 MECANISME D'ACCIÓ

El Glifosat inhibeix en plantes, bacteries, algues, fongs i paràsits la 5-enolpiruvil shikimat-3-fosfat sintetasa (EPSPS), enzim clau per a la síntesi dels aminoàcids aromàtics i per tant, resulta inofensiu per als animals i per als éssers humans ja que obtenen els aminoàcids aromàtics essencials a partir de la dieta.

L'EPSPS pertany a la família de les transferases, específicament a la transferència de grups acil. L'enzima catalitza la conversió del fosfoenolpiruvat (PEP) i del shikimat-3-fosfat (S3P) a 5-enolpiruvil-shikimat 3-fosfat (EPSP), corresponent al 6<sup>è</sup> pas dins la via de shikimat (Fig.4).

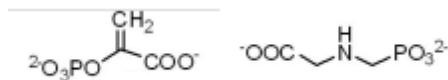
En condicions normals, l'etapa inicial de la via del shikimat consisteix en la condensació de PEP (un intermediari glucolític) amb 4-fosfat d'eritrosa (un intermediari de la ruta dels fosfats de pentosa). El sucre de la cadena oberta de set carbonis resultant s'oxida, perd el grup fosforil i se ciclitza a 3-deshidroshikimat, que es reduït a shikimat per l'NADPH. La fosforilació del shikimat per l'ATP dona lloc a la S3P que gràcies a l'EPSPS és condensa amb una segona molècula de PEP donant lloc a l'EPSP.

L'intermediari EPSP resultant perd el grup fosforil i és converteix en corismat, el precursor comú dels tres aminoàcids aromàtics.

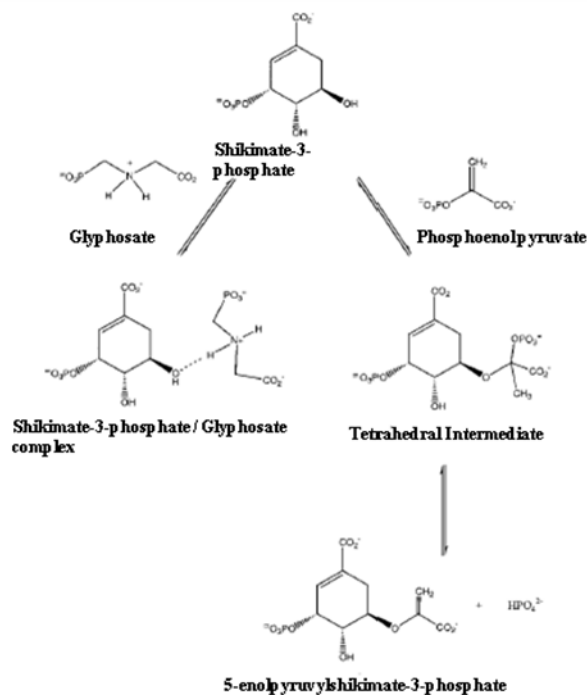


**Fig.4.** Via del Shikimat que condueix a la biosíntesi d'aminoàcids aromàtics i mètode d'acció del Glifosat en la reacció catalitzada per la EPSPS.

L'estructura química del Glifosat i el PEP són molt similars (Fig.5), d'aquí prové el caràcter herbicida del Glifosat. Quan s'aplica Glifosat a les plantes, aquest actua com a inhibidor competitiu del PEP i ocupant el seu lloc és combina més fortament amb el complex EPSP sintetasa (Fig.6)

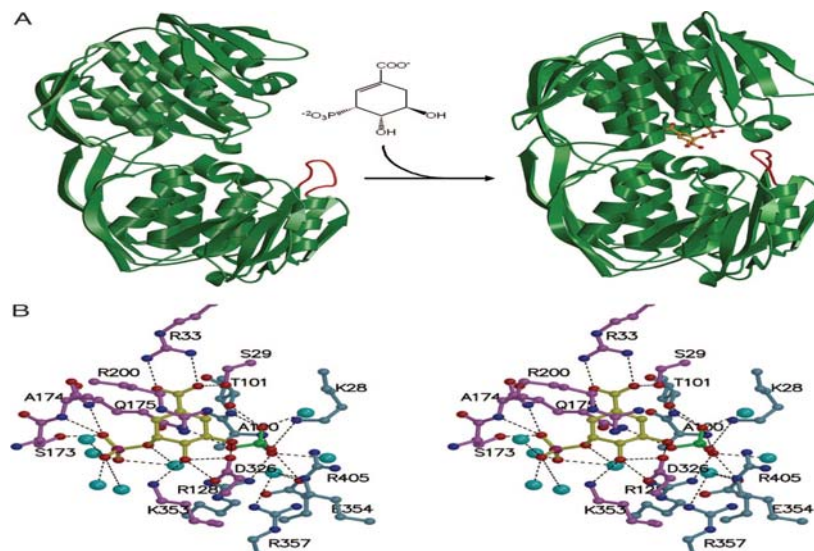


**Fig.5.** Formula química de PEP i del Glifosat, respectivament



**Fig.6.** Estructures químiques formades amb la interacció amb el PEP a la dreta, i amb el Glifosat a l'esquerra.

L'EPSPS és una enzima monomèrica, amb dos dominis globulars, cadascun compost de tres unitats de plegats idèntics, connectats entre si per una regió de frontissa. L'estructura de l'enzima quan està formant el complex amb S3P és més compacte (Fig. 7), el que suggereix un mecanisme d'ajust induït, en què els dos dominis globulars s'aproximen entre si després de la unió de S3P. Aquesta transició obert-tancat crea un ambient confinat i altament carregat immediatament adjacent al grup hidroxil de S3P, a la qual el Glifosat o el PEP s'uneixen (Funke, Han, Healy-fried, Fischer, & Scho, 2006).



**Fig.7.** Estructura tridimensional de l'EPSPS. A) EPSPS en una conformació oberta quan no està lligada. A la dreta, després de l'interacció amb S3P, l'enzim pateix un gran canvi en la conformació a un estat tancat. Es mostra en taronja un bucle de residus 347-358, flexible en la conformació oberta, però ordenat en la conformació tancada. Aquest bucle conté els residus conservats de Glu-354 i Arg-357, que estan implicats en la unió del PEP o del Glifosat. B) Unió del complex binari S3P (groc) als residus d'enzims (magenta) a través de múltiples enllaços d'hidrogen i d'interaccions electrostàtiques (línees punts negres). A més, la resta de ciclohexà de S3P s'intercala entre Glu-354 i Arg-357, proporcionant la conformació adequada per la interacció amb el PEP o el Glifosat. Els residus que es mostren en blau clar constitueixen el lloc d'unió del Glifosat o del PEP.



Tanmateix, igual que el PEP, el Glifosat no presenta afinitat per l'enzim aïllat, és a dir, tan el PEP com el Glifosat no es combinen amb l'EPSPS, sinó al complexa EPSPsintasa-S3P, ja que com s'ha dit, la Interacció només és pot donar quan l'EPSPS és troba en estat tancat lligada amb la SP3(Fig.7) (Funke et al., 2006).

Al contrari que amb el PEP, la taxa de dissociació del complexa EPSP sintetasa – S3P-glifosat és 2000 cops més lenta que la taxa de dissociació de EPSP sintasa-S3P-PEP(Tan, Evans, & Singh, 2006). Per això, un cop el Glifosat s'associa a l'enzim EPSPS aquesta és incapaç de catalitzar les seves reaccions normals en la ruta metabòlica del shikimat (Fig.4). En conseqüència, no es poden sintetitzar els aminoàcids aromàtics, causant així la mort de la planta .

### 3.3 MECANISMES DE RESISTÈNCIA

En 1996, 22 anys després del llançament al mercat del herbicida Glyphos® amb Glifosat com a matèria activa, és va informar del primer cas de resistència a l'herbicida per l'espècie de planta *Lolium rigidum* (Vallica) a Argentina (Villalba, 2009) .Aquesta espècie va ser la primera de moltes altres que han anat sorgint al llarg d'aquets anys, que amb mutacions naturals han obtingut biotips resistents (Taula 1).

Espècie	Any	País
<i>Amaranthus palmeri</i>	2005	USA
<i>Amaranthus rudis</i> (Amarantos)	2005	USA
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	2005	USA
<i>Ambrosia trifida</i> (Ambrosia )	2004	USA
<i>Conyza bonariensis</i> (Rama negra)	2003	Sud-àfrica, Espanya, Brasil, Colòmbia, USA
<i>Conyza canadensis</i> (Coniza canadensa)	2000	USA, Brasil, China, Espanya, República txeca
<i>Digitaria insulares</i> (Camalote)	2006	Paraguai i Brasil.
<i>Echinochloa colona</i> (Arocillo)	2003	Austràlia
<i>Eleusine indica</i> (Capín)	2000	Malàcia i Colòmbia
<i>Euphorbia heterophylla</i> (Lecherón)	2006	Brasil
<i>Lolium multiflorum</i> (Margall italià)	2001	Brasil, USA, Espanya i Argentina.
<i>Lolium rigidum</i> (Vallica)	1996	Austràlia, Argentina, USA, Sud-àfrica, Espanya i França
<i>Plantago lanceolata</i> (Orella de llebre)	2003	Sud-àfrica
<i>Sorghum halepense</i> (Sorgo d'Alep)	2005	Argentina i USA

**Taula 1** . Espècies resistents de forma natural al Glifosat, reconegudes a nivell mundial.

De les diverses alternatives per induir la resistència a herbicides mitjançant la manipulació genètica, només dos són utilitzades amb èxit amb herbicides comercials; l'alteració del gen del enzim diana i la desintoxicació del herbicida a través del metabolisme (Pollegioni et al., 2012).

La modificació de l'objectiu de l'herbicida té un enfocament defensiu, fent que l'enzim objecte sigui menys sensible o insensible al herbicida, mentre que la desintoxicació de l'herbicida és un plantejament ofensiu, mitjançant l'acció d'un enzim del metabolisme per degradar l' herbicida abans que aquest pugui arribar a l'enzim objecte.

Ruta inhibida	Blanc primari	Estratègies per la resistència	
		Alteració del gen diana	Desintoxicació
Biosíntesi aminoàcids	EPSPS	Gen aroA (bacteri)	Gen gox (bacteri)
		Enzima CP4-EPSPS	Enzima GOX

**Taula 2.** Mecanismes de genètics utilitzats per produir cultius resistents al Glifosat

### 3.3.1 INSENSIBILITAT MITJANÇANT L'ALTERACIÓ DEL GEN DE L'ENZIM DIANA

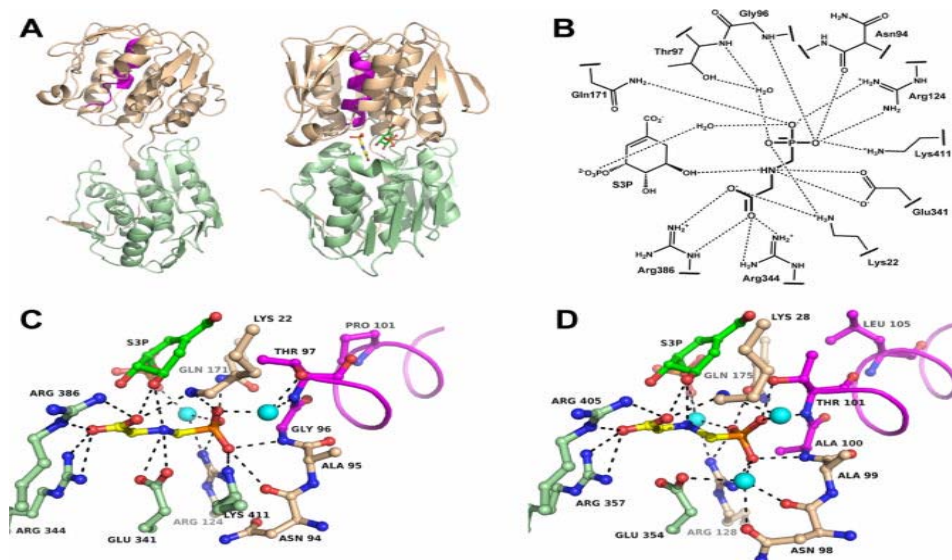
L'estratègia d'aquesta resistència de caràcter defensiu, és basa en la substitució de l'enzim EPSPS per una variant d'aquesta, capaç de mantenir l'activitat de l'EPSPS natural dins la via del shikimat en presència de Glifosat.

A partir de principis dels any 80, es va començar a investigar per tractar d'identificar una EPSPS tolerant al Glifosat, amb l'objectiu d'introduir i d'expressar resistència en les cèl·lules de plantes. És van identificar una sèrie d'enzims prometedors mitjançant l'evolució selectiva, la mutagènesi dirigida al lloc, i les pantalles microbianes. No obstant això, un increment de la tolerància al Glifosat per la EPSPS anava acompanyat, sovint, per una disminució de l'afinitat de l'enzim EPSPS pel PEP, el que resulta en la disminució de l'eficiència catalítica (Comai, Sen, & Stalker, 1978).

Finalment, es van identificar microbis amb tolerància natural al Glifosat, com la soca *Agrobacterium sp* CP4, aïllada d'una columna de residus alimentats en una instal·lació on es produïa glifosat (Pollegioni et al., 2012). Es va comprovar que aquesta portava una EPSPS cinèticament més eficient, anomenada CP4-EPSPS, que va ser designada com a EPSPS de classe II sobre la base de la seva tolerància al Glifosat i la seva eficàcia catalítica.

Tot i això, no va ser fins al 1985 quan es va identificar la base molecular d'insensibilitat al Glifosat amb l'obtenció d'una soca de *Salmonella typhimurium* resistent al Glifosat mitjançant la mutació induïda amb etilmetanosulfonat del gen *aroA*, el locus que codifica en bacteries entèriques l'enzim EPSPS (Stalker, Hiatt, & Comai, 1985).

La comparació de la seqüència del gen del mutant i del tipus salvatge va revelar dos diferències significatives; la substitució de Prolina per Serina en el codó 101 de la proteïna i el reemplaçament de Glicina per Alanina en el codó 100 (Fig.8). Tot i que, es va poder comprovar que amb una únic canvi de bases, és pot aconseguir la resistència; la substitució de Gly-100-Ala proporciona resistència al Glifosat a causa del grup metil que sobresurt en el lloc d'unió, mentre que el canvi de bases en el codó 101 donen resistència com a resultat dels canvis estructurals del lloc actiu per impacte de l'orientació espacial del bucle de residus de l'enzim (Pollegioni et al., 2012). Tanmateix, la diferència en la seqüència d'aminoàcids proporciona els canvis en la conformació necessaris per una alta eficiència catalítica i resistència al Glifosat.



**Fig.8.** La manera d'acció molecular de Glifosat i la base estructural per a la resistència al Glifosat. A) Estructures cristal·lines de l'enzim de *Escherichia coli*, amb el domini globular N-terminal de color verd i el domini C-terminal de color cru. Les molècules SP3 i Glifosat és mostren en verd i groc, respectivament. Es mostra com la unió de SP3 induïx a una conformació més tancada de la EPSPS en la qual el Glifosat o el substrat PEP s'uneixen. B) Representació esquemàtica del potencial d'unió d'hidrogen i les interaccions electrostàtiques entre el glifosat i el lloc actiu dels residus. C) Lloc d'unió del Glifosat en l'EPSPS de tipus salvatge de *E.coli*. Els residus que és substitueixen en enzims resistent s'indiquen en magenta. D) Lloc d'unió del glifosat en l'enzim CP4-EPSPS mutant.

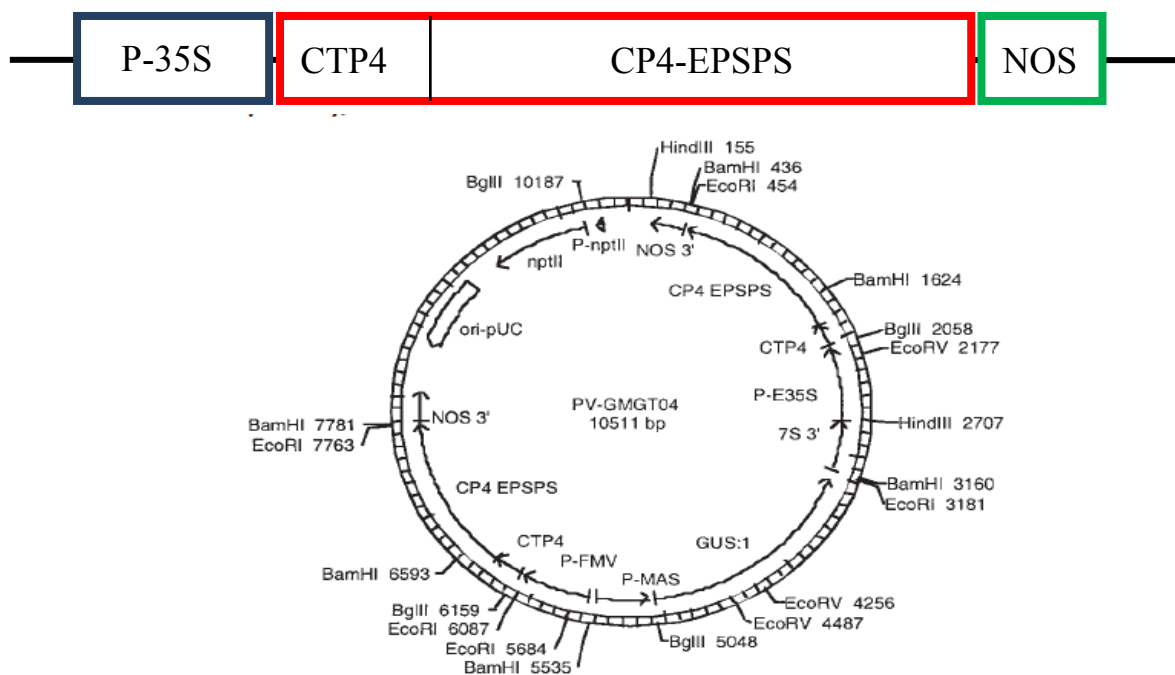
La soja RR (Roundup Ready) va ser el primer cultiu MG resistent al Glifosat comercialitzat el 1996 per la companyia Monsanto (Duke & Powles, 2009).

La línia de soja RR és va desenvolupar utilitzant l'acceleració de partícules com a mètode de transferència del DNA del plasmidi amb la seqüència del gen que codifica la proteïna CP4-EPSPS en la varietat de soja comercial A5403 (*Glycine max*).

El plasmidi contenia la seqüència codificant del gen *aroA*, que correspon a la CP4-EPSPS aïllada de la soca de *Agrobacterium tumefaciens* expressada sota el control del fort promotor constitutiu del CaMV 35S (del virus del mosaic de la coliflor) i acabat amb la seqüència terminadora t-nos del gen nos (Nopalina Sintetasa) (Fig.9).

Degut a que les bactèries del sòl no presenten cloroplasts, el gen *aroA* no inclou la seqüència de DNA que codifica per el pèptid de transport necessari per transportar l'enzima CP4-EPSPS des del nucli de la cèl·lula on es codifica fins al cloroplast, on es localitza la ruta de shikimat. Per això, una seqüència de DNA derivada de *Petunia hybrida* que codifica per a un pèptid de trànsit cloroplàstic (CTP) es va clonar en l'extrem 5' del gen CP4-EPSP, determinant així, la producció d'una proteïna de fusió que facilita la importació de l'enzim recentment traduït fins el cloroplast de la planta. Un cop l'enzim s'ha importat fins al cloroplast el pèptid de transport és eliminat i ràpidament degradat per proteases específiques.

En efecte, com es mostra en la Figura 9, la inserció primària de DNA inclou una còpia senzilla del *cassette* CP4-EPSPS amb; el promotor E35S, les seqüències que codifiquen el pèptid de transició al cloroplast i la proteïna CP4-EPSPS, i el terminador de transcripció nos 3'. La seqüència que codifica la CP4-EPSP inclou els codons d'inici i terminació de traducció, codificant els 456 aminoàcids que donen lloc a la síntesis de la proteïna funcional CP4-EPSPS de 46 kDa.



**FIG.9.** Mapa del constructe amb els elements introduïts (blau: promotor, vermell: seqüència codificant, verd: terminador). Mapa plasmidi PV-GMGT04 utilitzat per produir la soja Roundup Ready 40-3-2.

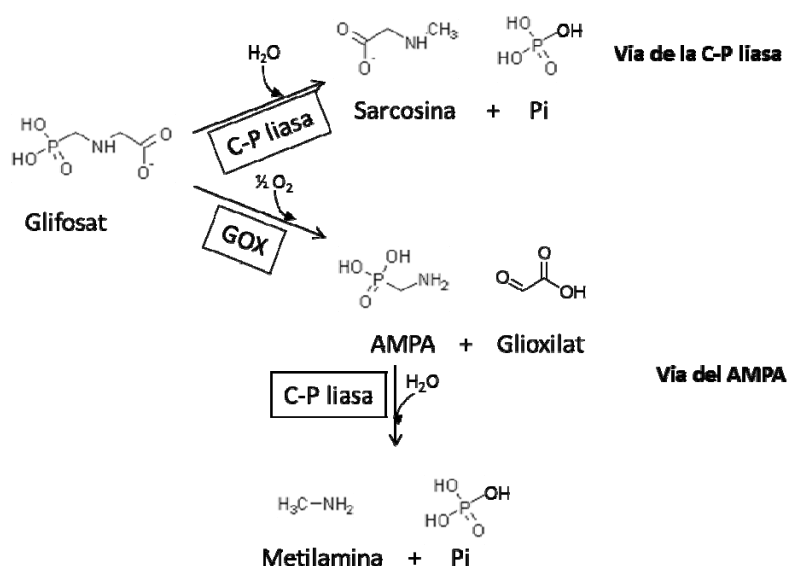
### 3.3.2 INSENSIBILITAT MITJANÇANT LA DESINTOXICACIÓ

La desintoxicació del Glifosat és una altra estratègia que s'ha emprat per conferir resistència dels cultius al herbicida, però en aquest cas és tracta d'un mecanisme ofensiu, amb la intenció d'eliminar l'herbicida.

En la primera estratègia, el gen *aroA* mutant assegura l'activitat catalítica de l'EPSPS en presència de Glifosat, no obstant això, el Glifosat roman a la planta i s'acumula en els meristemes, on pot interferir en el desenvolupament reproductiu i disminuir el rendiment del cultiu. L'avantatge de la desintoxicació del Glifosat és l'eliminació dels residus d'herbicida, que resulta en un augment de la tolerància i el desenvolupament reproductiu normal de la planta.

El mecanisme de desintoxicació del Glifosat va ser identificat en la natura, ja que es tracta d'una reacció que es produeix en condicions naturals quan el Glifosat es troba en el sòl (Duke, 2011). Tal i com s'ha dit, el Glifosat és l'herbicida més utilitzat en tot el món gràcies a la seva efectivitat, el baix cost i la baixa toxicitat, però també al baix impacte ambiental degut a la persistència limitada de la molècula en el sòl. La baixa persistència és deu a la seva degradació microbiana per bacteries, sobretot els microorganismes del gènere *Pseudomonas*, capaces d'utilitzar el Glifosat com a font de fòsfor i de carboni.

El catabolisme del Glifosat pot donar-se per dues rutes diferents (Fig.10); la via liasa CP i la ruta d'àcid aminometilfosfònic. La primera via és basada en l'escissió de l'enllaç carboni-fòsfor del Glifosat, el que dona lloc a la formació de fosfat i sarcosina, gràcies a l'enzim carboni-fòsfor (C-P) liasa. En la segona via, hi ha una escissió oxidativa de l'enllaç carboni-nitrogen del costat carboxil del Glifosat, catalitzada per l'enzim glifosat-oxidoreductasa (anomenat GOX) que dona lloc a la formació d'àcid aminometilfosfònic (AMPA), i a Glioxilat.



**Fig.10.** Principals rutes de degradació del Glifosat per les bacteries del sòl.

Cap d'aquests mecanismes s'ha demostrat que es produeixen en les plantes superiors en grau significatiu; la via de la liasa CP requereix un nombre desconegut de gens i l'activitat no s'ha reconstituït *in vitro*, posant en dubte la capacitat de crear l'activitat en plantes transgèniques. La via d'AMPA sembla ser la predominant per a la degradació de Glifosat en el sòl per un gran nombre de bacteris Gram-positives i Gram-negatives.

Del centre de producció de Glifosat, d'on es van identificar microbis amb tolerància natural, *Ochrobactrum anthropi*, abans anomenat soca LBAA *Achromobacter* sp, va ser aïllat i identificat així per la seva capacitat de poder utilitzar Glifosat com una font de fòsfor.

D'aquesta soca, es va aïllar el gen *gox* que codifica la glifosat-oxidoreductasa (GOX), una flavoproteïna FAD que conté 430 aminoàcids i que com ja s'ha dit, és responsable de la degradació del Glifosat per la ruta de l'AMPA.

GOX utilitza l'oxigen com a cosubstrat i així l'enzim recombinant catalitza l'escissió de l'enllaç C-N del Glifosat. El mecanisme implica la reducció del cofactor FAD per la primera molècula de Glifosat, obtenint FAD reduïda i una base de Schiff d'AMPA amb glioxilat que a continuació s'hidrolitza en components individuals. La flavina reduïda és torna a oxidar per oxigen produint una oxigenada flavina intermèdia. Aquest intermedi catalitza l'oxigenació d'una segona molècula de Glifosat.

L'enzima GOX s'utilitza en combinació de la CP4-EPSPS insensible al Glifosat, ja que el mecanisme de desintoxicació per si sol és insuficient per fer front a les altes concentracions de Glifosat utilitzades com herbicides.

Conjuntament amb la soja RR, a partir de 1996 van entrar al mercat altres cultius Roundup Ready amb resistència al Glifosat adquirida mitjançant les estratègies anteriorment mencionades (Taula 2). En 2007 aquests cultius transgènics van ser sembrats en els països desenvolupats i en desenvolupament en més de 113 milions d'hectàrees en tot el món, que representen casi un 10% de les terres de cultiu en secà.

Espècie	Promotor	Seqüència codificant	Any
<i>Glycine Max</i> (Soja)	E35S*	CP4-EPSPS	1996
<i>Brassica napus</i> (Cànula)	FMV *	CP4-EPSPS / GOX	1996
<i>Gossypium hirsutum L.</i> (Cotó)	FMV	CP4-EPSPS	1997
<i>Zea mays L.</i> (Blat de moro)	E35S / Actina d'arròs	CP4-EPSPS	2001

**Taula 2.** Espècies de cultius OMG resistents al Glifosat disponibles a nivell comercial en varis països.

\* FMV *Figwort mosaic virus* (virus del mosaic de l'escrofulària) \*E35S (del virus del mosaic de la coliflor)

## 4. VISIÓ ACTUAL

En l'ús de varietats transgèniques hi ha interessos que és contraposen; estan per una banda, els productors, distribuïdors i la indústria biotecnològica i per altre, els ecologistes i les associacions de consumidors que funcionen en països desenvolupats.

Per un banda, és defèn que les característiques millorades adquirides permeten incrementar la productivitat a nivell de camp, ja sigui reduint els inputs requerits o augmentant el rendiment, mantenint una agricultura sostenible amb:

- La disminució del número d'herbicides utilitzats, ja que és possible utilitzar un únic herbicides d'ampli espectre, el que disminueix considerablement els costos en el control de les males herbes.
- El reemplaçament d'herbicides amb propietats ecològiques superiors i/o toxicològiques inferiors, que ajudin a reforçar l'ecologia sostenible.
- Disminució de danys en els cultius, per el fet de ser resistents, de forma específica a un determinat herbicida sempre i quant és compleixi amb la dosi i tipus d'herbicida recomanat.
- Millora de l'eficàcia en el control de les males herbes en comparació amb el programa d'herbicides utilitzats en cultius convencionals, ja que és simplifica el seu control al substituir els herbicides pre-emergents específics, utilitzats com a prevenció, per només un herbicida post-emergent d'ampli espectre, que pot ser utilitzat quan és necessari, i permet als agricultors implementar les pràctiques d'agricultura de conservació, i per tant, reduir el impacte mediambiental.
- Augment en l'eficiència de recursos al reduir la dependència de la mecanització.

D'altra banda, la pèrdua de la biodiversitat a causa de l'alta pressió de selecció sobre la flora local, la possible aparició de males herbes resistents al herbicida, el increment en l'ús de l'herbicida en el temps per tal de poder controlar les millorades adventícies, la dependència absoluta dels usuaris per las poques empreses que proporcionen les llavors transgèniques i la transmissió potencial de gens resistents a herbicides a varietats silvestres són alguns dels riscos que exposen els opositors.

Tanmateix, aquest enfrenament obeeix a una falta de transparència i d'estratègies no adequades d'informació, que han fet augmentar la desconfiança i el rebuig cap als OMG, el que ha esdevingut el problema principal de l'utilització dels OMG ; la falta d'informació clara, concisa i amb base científica en la qual els usuaris puguin accedir a tota la informació referent. Moltes de les pàgines més freqüentades on es troba informació sobre els OMG estan basades en suposicions que s'accepten com a vertaderes sense tenir una base científica provada, així com, en la informació provinent dels defensors no s'inclou els possibles desavantatges o riscos (Kramm M., 2003).

L'adopció de cultius transgènics a nivell mundial ha estat ràpida i impresive, arribant a 120 milions d'hectàrees el 2012, i amb un ritme de creixement constant.

Tot i així, el creixement és molt desigual entre països; actualment, els països que lideren aquest desenvolupament són els Estats Units, Brasil, Argentina, Canadà, l'Índia i la China.

Avui dia, existeixen 15 OMG autoritzats en la Unió Europea per a l'alimentació, entre els quals 11 estan modificats genèticament per tolerar a herbicides.  
[http://europa.eu/legislation\\_summaries/agriculture/food/121154\\_es.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/food/121154_es.htm)

Els OMG autoritzats per a la seva comercialització en la UE són objecte d'una rigorosa avaluació científica portada a terme per la EFSA, en quant a la seva seguretat per a la salut humana i el medi ambient, sota els criteris d'avaluació de seguretat dels aliments OMG definits i regulats en el reglament (CE) N° 1829/03 sobre aliments i pinsos modificats genèticament.

## 5. CONCLUSIONS

Obtenir informació amb un llenguatge fàcil i resumit d'algunes estratègies que s'assumeixen per aconseguir cultius modificats genèticament, tal com en aquest treball, ajuda a entendre millor el procés que regeix un organisme modificat genèticament, ja que la pitjor oposició dels OMG són les reaccions negatives de la societat davant el risc del que els hi es desconegut.

És necessari realitzar campanyes de difusió dels aspectes científics de la biotecnologia dirigida al públic, amb el fi d'arribar al consens necessari per continuar investigant tenint en compte les preocupacions vàlides i resolent els interrogants que encara no tenen resposta. És indispensable que les decisions sobre el futur dels OMG és basin en realitats, ja que la indústria de la biotecnologia agrícola ha ressaltat excessivament els beneficis i ha minimitzat els possibles riscos, mentre que els opositors de la indústria han ignorat els beneficis i maximitzat els riscos.

S'ha de disposar d'informació científica objectiva, per poder avaluar adequadament les potencialitats i els riscos dels OMG i així, aprofitar el màxim els beneficis que poden oferir per poder resoldre les necessitats creixents de la població i compaginar-les amb la cerca de noves alternatives que reforcin l'agricultura sostenible.

D'altra banda, crec que milions de persones de països en desenvolupament, que careixen d'aliments per subsistir o de diners suficients per adquirir-los, es podrien beneficiar de tota la tecnologia que pugui incrementar la producció agrícola, reduir els costos mitjançant una reducció de l'ús dels herbicides i permetre la utilització de grans superfícies desaprofitades per condicions ambientals desfavorables.

Així doncs, crec que els possibles beneficis dels organismes transgènics són immensos, però per tal que puguin ser aprofitats s'ha de promoure sistemes d'avaluació eficients i objectius dels OMG i s'ha de fer arribar aquets resultats a la societat en un intent de retornar la confiança perduda i mitigar la por.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Alibhai, M. F., & Stallings, W. C. (2001). Closing down on glyphosate inhibition — with a new structure for drug discovery. *PNAS*, 98(4), 2944–2946.

Berg, Jeremy M., Tymoczko, Jhon L., Stryer, L. (2007). Bioquímica (6a ed., p. 1012). Reverté, S.A.

Castle, L. A., Siehl, D. L., Gorton, R., Patten, P. A., Chen, Y. H., Bertain, S., ... Lassner, M. W. (2014). *Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene*. *Science* (Vol. 1151, pp. 1151 – 1153). doi:10.1126/science.1096770

Cheminova. (2001). GLIFOSATO - MANUAL TECNICO.

- Comai, L., Sen, L. C., & Stalker, D. M. (1978). An altered *aroA* Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate, *221*(9), 9–10.
- Deboer, D. L., Deng, M. Y., George, C., Hillyard, J. R., Hironaka, C. M., Howe, A. R., ... You, J. (2005). Genomics, molecular genetics & biotechnology. *CROP SCIENCE*, 44, 329–339.
- Duke, S. O. (2011). Glyphosate Degradation in Glyphosate-Resistant and -Susceptible Crops and Weeds. *Agricultural and Food Chemistry*, 12, 5835–5841.
- Duke, Stephen O., Powles, S. B. (2009). Glyphosate-Resistance Crops and Weeds: Now and In the Future. *AgBioForum*, 12(3&4), 346–357.
- Exactas, C., & Aires, B. (2013). Control de malezas y resistencia a herbicidas. *Agrobiotecnología*.
- Funke, T., Han, H., Healy-fried, M. L., Fischer, M., & Scho, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *PNAS*, 6, 3–8.
- Kramm M., V. (2003). Cultivos transgénicos. Resistencia a herbicidas. *Biotecnología*.
- Lansing, E., & Simarmata, M. (2013). Glyphosate resistant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate.
- Lemaux, P. G. (2008). Genetically Engineered Plants and Foods: A Scientist's Analysis of the Issues (Part I). *Annual Review of Plant Biology*, 59, 771–812. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.103840
- Monsanto imagine. (2008). Antecedentes. Glifosato: No existe evidencia de carcinogenicidad.
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., & Siehl, D. (2012). Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering, 278(16), 2753–2766. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x. Molecular
- Puricelli, E.; Tuesca, D. (2005). Efecto del sistema de labranza sobre la dinámica de la comunidad de malezas en trigo y en barbechos de secuencias de cultivos resistentes a glifosato. *Agriscientia*, XXII(2), 69–78.
- Stalker, D. M., Hiatt, W. R., & Comai, L. (1985). A single Amino Acid Substitution in the Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(April 25), 4724–4728.
- Tan, S., Evans, R., & Singh, B. (2006). Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, 30(2), 195–204. doi:10.1007/s00726-005-0254-1
- Vasil, I. K. (2007). Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 26(8), 1133–54. doi:10.1007/s00299-007-0338-3
- Villalba, A. (2009). Resistance to Herbicides . Glyphosate. *Exact and Naturales Sciences*, 39(Ciencia, Docencia y Tecnología), 169–186.
- Wang, W., Xia, H., Yang, X., Xu, T., Si, H. J., Cai, X. Lu, B. (2013). A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate ( EPSP ) synthase transgene for glyphosate resistance stimulates growth and fecundity in weedy rice ( *Oryza sativa* ) without herbicide. *New Phytologist*, 17.